

Excerpt Translation of Japanese Patent Kokai No. 143,466/96

Translation of page 2, first column, lines 1-6

"[Claims]

1. An antioxidant and active-oxygen eliminating agent derived from a mulberry or mulberry leaf.

2. An antioxidant and active-oxygen eliminating agent obtainable by extracting a mulberry or mulberry leaf with water or a readily-water-soluble organic solvent."

(19) 日本国特許庁 (J P) (12) 公開特許公報 (A) (11) 特許出願公開番号

特開平 8-143466

(43) 公開日 平成 8 年 (1996) 6 月 4 日

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A61K 35/78	AED	D 8217-4C		
A23L 3/3436				
3/3472				
C09K 3/00		S		
15/34				

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平 6-280879

(22) 出願日 平成 6 年 (1994) 11 月 15 日

(71) 出願人 592004998
三基商事株式会社
大阪府大阪市北区梅田 1 丁目 2 番 2-80
0 号

(72) 発明者 濱野 計希
兵庫県西宮市鳴尾浜 3 丁目 12 番 4 号 三
基商事株式会社総合研究所内

(72) 発明者 栢野 新市
兵庫県西宮市鳴尾浜 3 丁目 12 番 4 号 三
基商事株式会社総合研究所内

(72) 発明者 芳谷 道男
兵庫県西宮市鳴尾浜 3 丁目 12 番 4 号 三
基商事株式会社総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 石田 定次 (外 1 名)

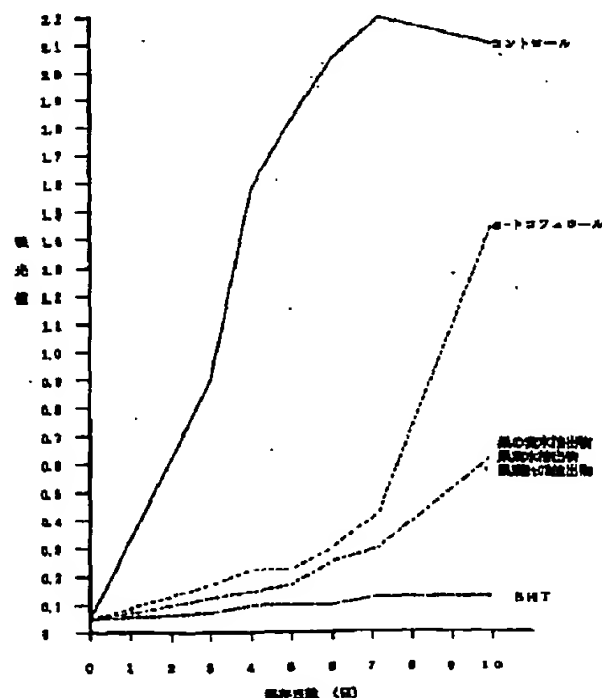
(54) 【発明の名称】 天然抗酸化剤および活性酸素消去剤

(57) 【要約】

【目的】 食品、食品添加物、化粧品、医薬等の分野において利用可能であり、酸化による品質低下を防ぎ、さらに活性酵素を消去する作用を合わせ持つ天然物由来の抗酸化剤および活性酵素消去剤を安価に提供することを目的とする。

【構成】 桑の実、桑の葉由来の抗酸化剤および活性酸素消去剤と桑の実および桑の葉を水若しくは親水性有機溶媒で抽出して得られる有効成分を含有する抗酸化剤および活性酸素消去剤。

抗酸化力測定試験 (ロジニ試験法)



【特許請求の範囲】

【請求項1】 桑の実、桑の葉由来の抗酸化剤および活性酸素消去剤。

【請求項2】 桑の実、桑の葉を水若しくは親水性有機溶媒で抽出して得られる抗酸化剤および活性酸素消去剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、食品、食品添加物、化粧品、医薬等の分野に於いて利用可能な天然物由来の抗酸化剤および活性酸素消去剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】一般に酸素は、生命体にとって必須のものであるが、時には生体に害を及ぼすことがあり、また代謝により生成されるスーパーオキシドと呼ばれる活性酸素は、鉄や銅などの金属触媒により還元されて過酸化水素となり、さらに活性酸素中で最も反応性が高く、生体に害を及ぼすヒドロキシラジカルとなるが、この分子はDNAを切断し、また脂質を酸化し、老化促進因子とされる過酸化脂質を生成するだけでなく、通常生体内でSOD（スーパーオキシドディスムターゼ）と呼ばれる酵素により消去されるものの、ストレス、高齢化などによってこのSODが減少する結果、生体内でバランスが崩れ、活性酸素によって過酸化脂質が増加して、心筋梗塞、動脈硬化、糖尿病、癌、脳卒中、白内障、肩こり、冷え性、シミ、ソバカス、しわ等が生じる等の原因となる不都合があった。

【0003】このような不都合を解消するものとして、化学合成品のBHA（ブチルヒドロキシアニソール）、BHT（ブチルヒドロキシトルエン）等の抗酸化剤がある。また、活性酸素消去物質として、生体内の酵素であるスーパーオキシドディスムターゼ（SOD）が開発されている。

【0004】一方漢方では、桑はクワ科（Moraceae）の植物でヤマ桑（*Morus bombycis* Koidz.）、カラ桑（*Morus alba* L.）、チョウセン桑（*Morus mongorika* Schneid.）等の種類があり、桑の実（桑子）、桑の葉（桑葉）と呼ばれて漢方薬として、また、桑の実、桑の葉を乾燥し、煎じたり、煮詰めて軟膏としたり、桑の実をそのまま酒に浸して薬用酒としても飲用され、滋養強壮、抗糖尿病、解熱、鎮咳、涼血薬として用いられ、また、糖分とカロチンを含んだビタミンが含有していることから、現在ジャム等の食品としての利用が広がってきているが、この桑の実、桑の葉の抽出物の抗酸化およびSOD様活性については未だ報告されていない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】上記抗酸化剤は化学的合成品であり、活性酸素消去剤は、その精製が困難であるため著しく高価なものとなるだけでなく、熱に不安定で失活し易いため、近年、安全性、健康志向の面におい

て、また簡易で安価に得られる、SODと同様に活性酸素消去作用を示す、天然のSODの代用物質（SOD様活性物質）及び抗酸化物質の出現が望まれている。

【0006】本発明は、酸化による品質低下を防ぎ、さらに活性酸素を消去する作用を合わせ持つ天然の抗酸化剤および活性酸素消去剤を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は、上記状況に鑑みて鋭意研究を重ねた結果得たものであって、天然の、即ち、桑の実、桑の葉由来の抗酸化剤および活性酸素消去剤、又は桑の実、桑の葉を水若しくは親水性有機溶媒で抽出して得られる抗酸化剤および活性酸素消去剤を特徴とする。

【0008】

【作用】上記、天然の抗酸化剤は抗酸化活性を示し、得られる物質は天然由来のものでありながら、 α -トコフェロールより強く、化学合成品（BHT）と同等の抗酸化活性を示すものであり、また天然の活性酸素消去剤は、化学合成品と同様の活性酸素消去作用を示し、しかも、簡単な操作で安価にその物質を得ることができる。

【0009】

【実施例】本発明に係る抗酸化剤および活性酸素消去剤は、桑の実、桑の葉を水または親水性有機溶媒で抽出して得られる天然の抗酸化剤および活性酸素消去剤であって、抽出物の抗酸化活性、活性酸素消去作用に関する実施例および試験例を以下に具体的に示す。

【0010】（乾燥した桑の実の水抽出物の調製）

1. 桑の実の乾燥したものを水で洗浄した後、細かく刻み、この粉末20gに沸騰水1000mlを加え弱火で5分熱水抽出する。

2. この抽出エキスを120メッシュの金網に通し夾雑物を除去する。

3. 得られたエキスを50℃減圧下で1/10重量まで濃縮する。

4. この濃縮エキスを一晩凍結乾燥し、乾燥物を得る。上記手段により原料に対し23～28%の収率で乾燥物が得られた（なお、桑の葉についても前記と同操作を行いサンプルを調整した）。

【0011】（乾燥桑の実の親水性有機溶媒抽出物の調製）

1. 乾燥桑の実を水で洗浄した後、細かく刻み、この粉末20gにエタノール（99.5%）300mlを加え、攪拌後1日間放置した。

2. 得られたエキスを減圧下で濃縮、乾固する。上記手段により、原料に対し約4～16%の乾燥物が得られた（なお、桑の葉についても上記と同様の操作でサンプルを調整した）。

【0012】（SOD様活性測定）SOD様活性測定にはNBT法を用いた。これによって、キサントニンにキサントキシダーゼを作用させる事により、スーパーオ

キサイドが生成され、このスーパーオキシドがニトロブルーテトラゾリウム (NBT) を還元してホルマザンを生成するので、このホルマザン生成量を560 nmの吸光度で求めるとともに、SOD様活性物質はスーパーオキシドを消去してホルマザンの生成を抑えるため、その阻害率を求めることにより、SOD様活性を測定した。

【0013】A: 0.4%~2%の桑の実または桑の葉の水またはエタノール抽出物の水溶液0.1 mlに発色液(0.1 Mリン酸緩衝液 pH 8.0、キサンチン 0.4 mmol/l、ニトロブルーテトラゾリウム 0.24 mmol/l)を1.0 ml、酵素液(キサンチンオキシダーゼ 0.049 unit/ml、0.1 Mリン酸緩衝液 pH 8.0)を1.0 ml加え、37℃水浴中で20分間正確に加温した後、ドデシル硫酸ナトリウム溶液(69 mmol/l) 2.0 mlを加え、反応を停

止した後、分光光度計にてOD 560 nmの吸光値を測定する。

B: Aでの桑の実、または葉の水抽出物またはエタノール抽出物の水溶液の代わりに蒸留水を用いてOD 560 nmの吸光値を測定する。

C: Aでの酵素液の代わりに0.1 Mリン酸緩衝液 1.0 mlを用いてOD 560 nmの吸光値を測定する。

D: Aでの桑の実または桑の葉の水またはエタノール抽出物の水溶液の代わりに蒸留水を用い、そして酵素液の代わりに0.1 Mリン酸緩衝液 1.0 mlを用いてOD 560 nmの吸光値を測定する。上記A~Dの値を用いて以下の数式にしたがって、阻害率を求めた。

【0014】

【数1】

$$\text{阻害率\% (SOD様活性値)} = \frac{(B-D) - (A-C)}{(B-D)} \times 100$$

【0015】この結果、表1に示したように、反応液中の桑の実の水抽出物の濃度が1000 ppmの時に阻害率54%、200 ppmの時に23%、40 ppmの時に5%となった。また、桑の葉の水抽出物の濃度が1000 ppmの時に阻害率77%、400 ppmの時に35%、40 ppmの時に14%となった。更に、エタノール抽出物は、1000 ppmの時に73%、200 ppmの時に21%、40 ppmの時に2%となり、SOD様活性効果があることが示された。

【0016】

【表1】

試料抽出物濃度 (反応液中濃度 ppm)	阻害率 (%) (SOD様活性値)		
	桑の実	桑の葉	
	水抽出物	水抽出物	エタノール抽出
1000	54	77	73
200	23	35	21
40	5	14	2

【0017】抗酸化活性測定法 (ロダン鉄法)

試料濃度0.02%のエタノール溶液2 mlと2.51%のリノール酸エタノール溶液2 ml、0.05 Mリン酸Buffer (pH 7.0) 4 ml、水2 mlをスクリュウキャップ付きの褐色バイアル瓶(φ=35 mm、H=75 mm)に入れ、混合し、40℃のインキュベーターに保存し、一日毎に、この試料溶液を0.1 ml採集し、75%エタノールを9.7 ml、ロダン鉄アンモニウム水溶液0.1 mlをそれぞれ加え、さらに0.02 M塩化第二鉄3.5%塩酸溶液を0.1 ml添加して、正確に3分後のOD 500 nmの吸光値を測定した。この操作を一週間行ない、リノール酸の経時的な変

敗度を測定した。この結果、図1に示すように桑の実、桑の葉の水、またはエタノール抽出物は、α-トコフェロールより高く、BHTと同等の高い抗酸化活性があることがわかった。

【0018】次に桑の実、桑の葉の水抽出エキスを乾燥物を用いてL-アスコルビン酸の安定性試験を行なった。この安定性試験は、0.05 Mリン酸Buffer溶液 (pH 7.0) にL-アスコルビン酸0.1重量%の濃度で添加した試験液を作成し、その試験液50 mlに桑の実、桑の葉の水抽出エキスを乾燥物を200 ppm、500 ppmとなるように添加し(試料添加によるpHの変化はなかった。)、100 mlのスクリュウキャップ

付きの透明バイアル瓶に入れ、50℃で三日間保温した後、これを1/100に希釈し、OD265nmの吸光値を測定し、L-アスコルビン酸量を求め、L-アスコルビン酸残存量(%)として表した。

【0019】なお、対照は試験液のみを用い、また、エキス乾燥物由来のバックグラウンドを除くためblankとして0.05Mりん酸Buffer溶液(pH7.0)にエキス乾燥物を200ppm、500ppm添加したものをそれぞれ作成し、OD265nmの吸光値を測定し、これをサンプル吸光値から差し引いた。

【0020】図2に示す様に、L-アスコルビン酸残存量は対照24%に対し、桑の実の水抽出エキス乾燥物では200ppm添加の時37%となり、500ppm添加の時43%となり、桑の葉の水抽出エキス乾燥物では、200ppm添加の時30%、500ppm添加の時49%となり、桑の実および桑の葉の水抽出物はL-アスコルビン酸の保存性を高める効果があることが判った。

【0021】更に桑の実の水抽出エキスをを用いた色素褪

色防止効果の試験を行った。色素として市販のクチナシ黄色素(理研ビタミン(株)のリケンカラーシリーズ)を用いて、0.05Mりん酸Buffer溶液(pH7.0)に0.1%の濃度でクチナシ色素を添加した色素試験液を作成し、その色素試験液50mlに桑の実の水抽出エキス乾燥物を200ppmとなるように添加し(試料添加によるpHの変化はなかった。)、100mlのスクリュウキャップ付きの透明バイアル瓶に入れ、室内自然条件下にて6日間保存した。また、対照として色素試験液のみを用いて、6日後、これらの5倍希釈液のOD440nm吸光値を測定し、イニシャルの吸光値を100%として、クチナシ黄色素の残存率(%)として求めた。そして、blankとして0.05Mりん酸Buffer溶液(pH7.0)にエキス乾燥物を200ppmを添加した試験液を作成し、OD440nmの吸光値を測定し、これをサンプル吸光値から差し引いた。

【0022】

【表2】

試料抽出物濃度 (ppm)	クチナシ黄色色素 残存率(%)	
	0日目	6日目
0	100	49
200		77

【0023】表2に示すようにクチナシ色素の残存率(%)は対照の49%に対し、桑の実エキス乾燥物添加では77%であった。この結果より桑の実抽出エキスは色素分解を抑え、褪色防止に効果があることがわかった。

【0024】次に桑の実の水抽出エキスをを用いたβ-カロチン分解抑制効果の試験を行った。β-カロチンは市販の水溶液の天然β-カロチン粉末(タマ生化学株式会社)を用いて、0.05Mりん酸Buffer溶液(pH7.0)に0.05%濃度で天然β-カロチン粉末を添加したβ-カロチン試験液を作成し、そのβ-カロチン試験液50mlに桑の実の水抽出エキス乾燥物を200ppmとなるように添加し(試料添加によるpHの変

化はなかった。)、100mlのスクリュウキャップ付きの透明バイアル瓶に入れ、室内自然条件下にて6日間保存した。また、対照としてβ-カロチン試験液のみを用い、6日後、各試験液のOD460nm吸光値を測定し、イニシャルの吸光値を100%として、β-カロチンの残存率(%)として求めた。更に、blankとして0.05Mりん酸Buffer溶液(pH7.0)にエキス乾燥物を200ppmを添加した試験液を作成し、OD460nm吸光値を測定し、これをサンプル吸光値から差し引いた。

【0025】

【表3】

試料抽出物濃度 (ppm)	β-カロチン 残存率(%)	
	0日目	6日目
0	100	45
200		97

【0026】表3に示すようにβ-カロチンの6日間室内自然光条件下での残存率(%)は対照の45%対

し、桑の実の水抽出エキス乾燥物添加では97%であった。この結果より、桑の実の水抽出エキスはβ-カロチ

ンの分解を抑える効果があることがわかった。

【0027】近年、β-カロチンは機能性健康食品素材として注目されているが、200ppmの桑の実の水抽出エキスの添加で、安定化し、味、風味にも影響を与えないということは注目すべき点である。

【0028】以下に本発明品を用いた化粧水及び、飴、

(化粧水の処方例)

桑の葉の水抽出エキス乾燥物	0.20 %
1. 3. ブチレングリコール	6.00 %
グリセリン	4.00 %
香料	0.10 %
防腐剤	0.10 %
クエン酸	0.01 %
エタノール	5.00 %
精製水	84.59 %

計 100.00 %

(飴の処方例)

桑の実の水抽出エキス乾燥物	0.5 g
グラニュー糖	70.0 g
水飴	29.0 g
クエン酸	0.5 g

計 100.0 g

(飲料の処方)

桑の実の水抽出エキス乾燥粉末	25 mg
蜂蜜	5000 mg
エルダーベリー色素	200 mg
ペクチン	150 mg
香料	100 mg
クエン酸	150 mg
精製水	適量

計 50ml

(親水軟膏)

桑の葉の水抽出エキス乾燥粉末	0.2 g
白色ワセリン	25.0 g
ステアリルアルコール	20.0 g
プロピレングリコール	12.0 g
ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60	4.0 g
モノステアリン酸グリセリン	1.0 g
パラオキシ安息香酸メチル	0.1 g
パラオキシ安息香酸プロピル	0.1 g
精製水	適量

計 100.0 g

【0030】

【発明の効果】桑の実、桑の葉の水抽出物または親水性有機溶媒で抽出した物質に高いSOD様活性と抗酸化活性が示された。これは簡便な操作で安く得られるため、

飲料、軟膏の処方の一例を示すが、この処方に限定されるものではなく、食品類、各種化粧品類、医薬品等に配合することができる。また製造法は公知の方法に従い作成した。

【0029】

食品、食品添加物、化粧品、医薬等の分野での抗酸化剤、活性酸素消去剤としての利用価値があり、桑の実、桑の葉を利用したものについては抗酸化物質、SOD様活性物質を含有するため老化防止、健康増進にすぐれた

効果があるものとして各分野に提供することが可能である。

【図面の簡単な説明】

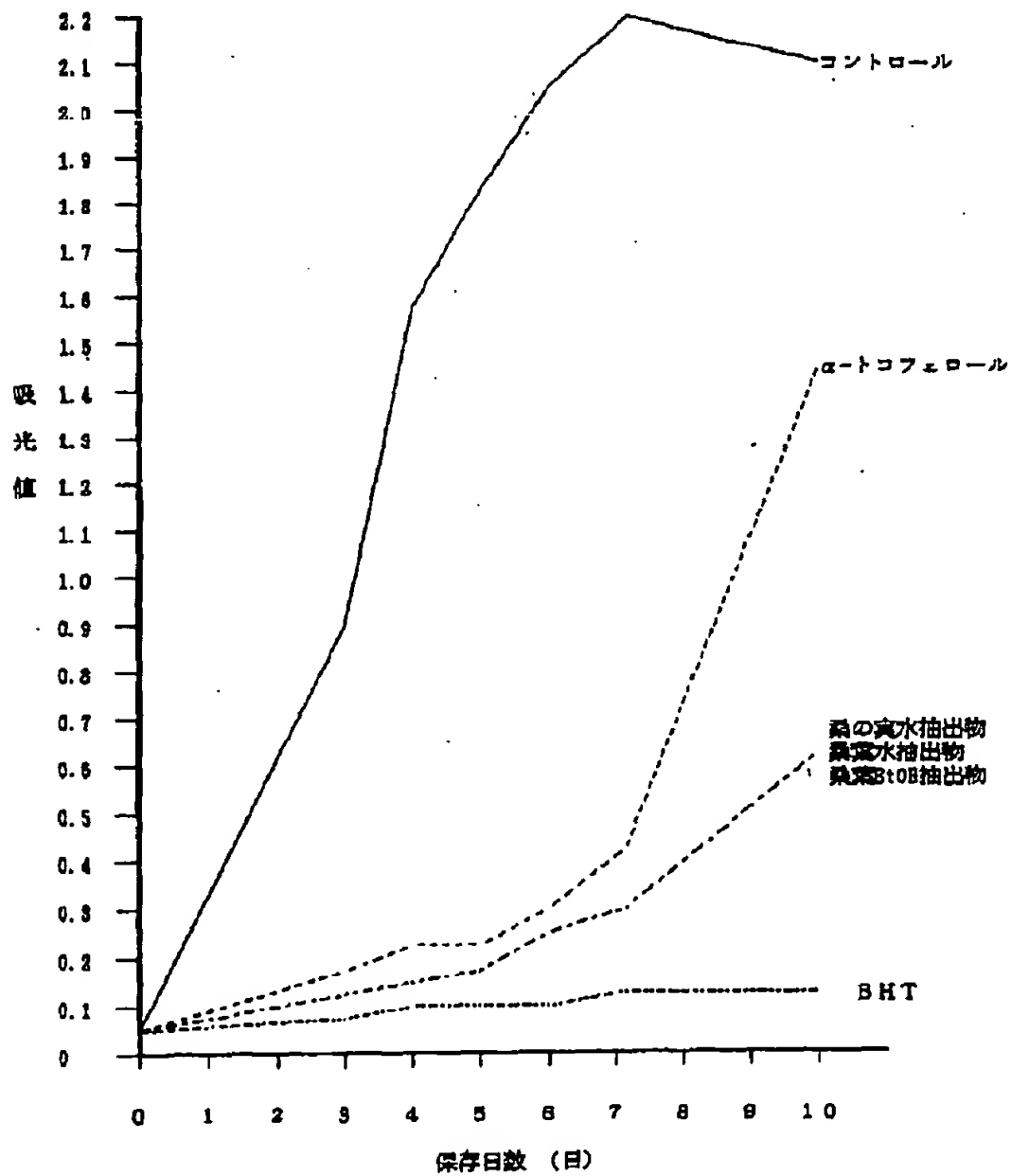
【図1】桑の実、桑の葉の水、及びエタノール抽出物と α -トコフェロール、BHTとの抗酸化活性の比較図で、縦軸は吸光値、横軸は各サンプル保存日数を表わ

す。

【図2】桑の実の水抽出物と桑の葉の水抽出物の0 ppm、200 ppm、500 ppm濃度添加でのL-アスコルビン酸の残存率比較図であって、縦軸は残存率、横軸は各サンプルを表わす。

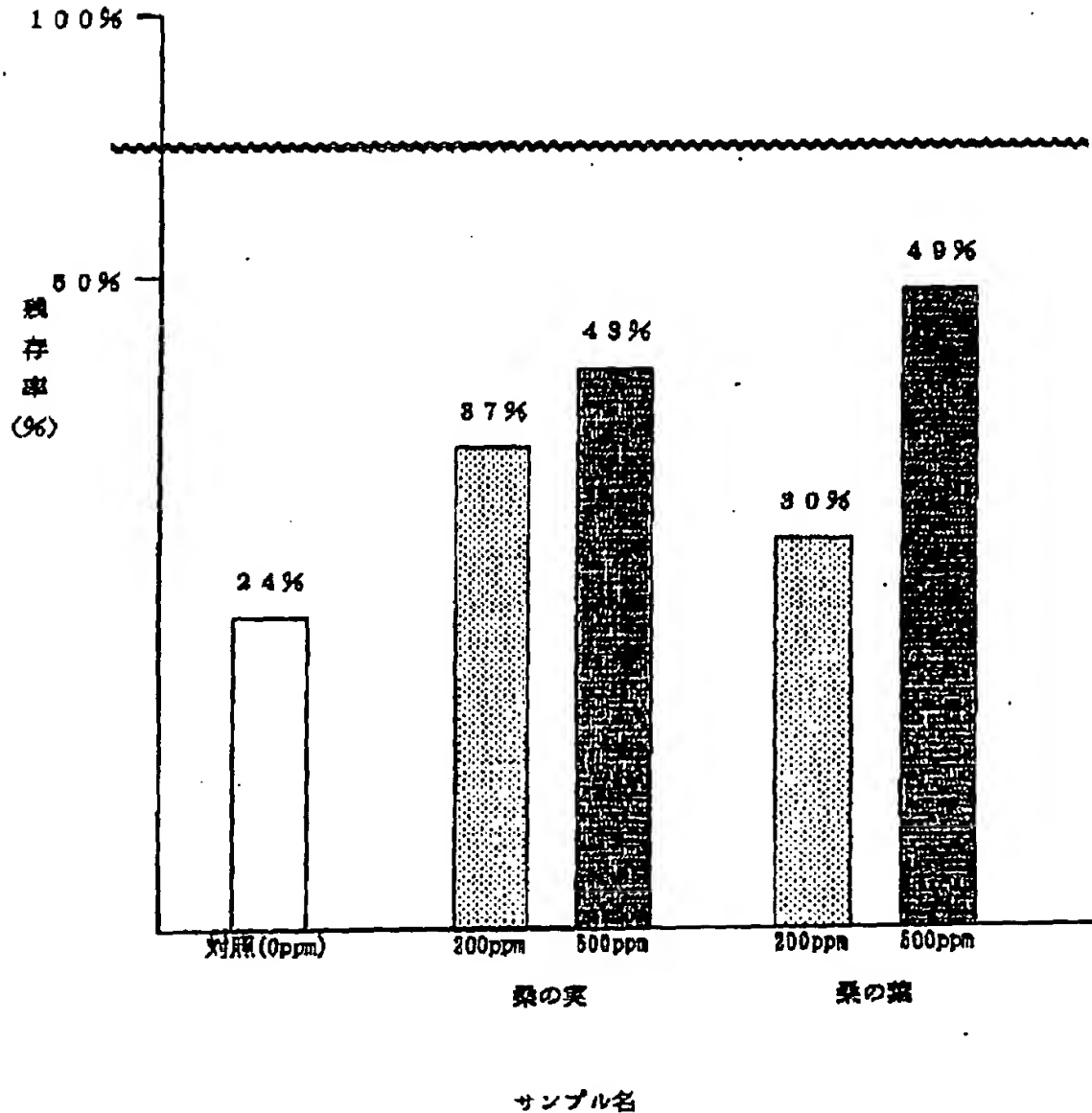
【図1】

抗酸化活性試験（ロダン鉄法）



【図2】

L-アスコルビン酸の安定性試験



【手続補正書】

【提出日】平成7年6月19日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0017

【補正方法】変更

【補正内容】

【0017】抗酸化活性測定法（ロダン鉄法）

試料濃度0.02%のエタノール溶液2mlと2.51%のリノール酸エタノール溶液2ml、0.05Mりん

酸Buffer (pH7.0) 4ml、水2mlをスクリュウキャップ付きの褐色バイアル瓶（φ=35mm、H=75mm）に入れ、混合し、40℃のインキュベーターに保存し、一日毎に、この試料溶液を0.1ml採集し、75%エタノールを9.7ml、3.0%チオシアン酸アンモニウム水溶液0.1mlをそれぞれ加え、さらに0.02M塩化第二鉄3.5%塩酸溶液を0.1ml添加して、正確に3分後のOD500nmの吸光値を測定した。この操作を一週間行ない、リノール酸の経時

的な変敗度を測定した。この結果、図1に示すように桑の実、桑の葉の水、またはエタノール抽出物は、 α -ト

コフェロールより高く、BHTと同等の高い抗酸化活性があることがわかった。